

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

ВЫЯВЛЕНИЕ ПРОДУКЦИИ БЕТА-ЛАКТАМАЗ БАКТЕРИЯМИ ПРИ ПОМОЩИ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «БИОЛАКТАМ»

СЕМЕНОВ В.М., ЖИЛЬЦОВ И.В., ДМИТРАЧЕНКО Т.И., ЗЕНЬКОВА С.К.,
СКВОРЦОВА В.В., КУБРАКОВ К.М., ВЕРЕМЕЙ И.С.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Нами была разработана тест-система «БиоЛактам», позволяющая регистрировать уровень бета-лактамазной активности в биологических субстратах. В настоящем исследовании мы оценили принципиальную возможность определения бета-лактамазной активности бактериальных суспензий при помощи указанной тест-системы, а также провели анализ соответствия получаемых результатов данным общепринятых методов бактериологического обследования. Как оказалось, тест-система «БиоЛактам» может успешно использоваться для качественной и количественной оценки бета-лактамазной активности бактериальных суспензий. Получаемые при этом результаты хорошо согласуются с данными исследований с применением диско-диффузионного метода. При помощи тест-системы «БиоЛактам» можно с высокой степенью достоверности определить: 1) факт продукции клинически значимых количеств бета-лактамаз при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии $\geq 14,2\%$; 2) факт устойчивости к ингибитор-защищенным бета-лактамам при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии $\geq 26,5\%$; 3) факт устойчивости к цефалоспорином 3-го поколения при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии $\geq 81,2\%$; 4) при совместном использовании с диско-диффузионным методом – также факт наличия неферментативных механизмов устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.

Ключевые слова: тест-система «БиоЛактам», бета-лактамазная активность, бактериальные суспензии, антибактериальная терапия, диско-диффузионный метод.

Abstract.

We have designed the test system «BioLactam» which is capable of registering the level of beta-lactamase activity in biological substrates. In the present study we have evaluated the fundamental possibility of determining beta-lactamase activity of bacterial suspensions using the above-mentioned test system; also we have performed the analysis of the conformance of the obtained results to the data of the routine methods of bacteriological examination. It has turned out that test system «BioLactam» may be successfully used for qualitative and quantitative evaluation of beta-lactamase activity of bacterial suspensions, and the results of testing are in good concordance with those got by the disk diffusion method. By means of test system «BioLactam» we can determine the following things with the high level of reliability: 1) production of clinically significant quantities of beta-lactamases if the level of beta-lactamase activity of bacterial suspension is $\geq 14,2\%$; 2) resistance to inhibitor-protected beta-lactams if the level of beta-lactamase activity of bacterial suspension makes up $\geq 26,5\%$; 3) resistance to cephalosporins of the 3rd generation if the level of beta-lactamase activity is $\geq 81,2\%$; 4) if used together with the disk diffusion method the presence of non-enzymatic mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics as well.

Key words: test system «BioLactam», beta-lactamase activity, bacterial suspensions, antibacterial therapy, disk diffusion method.

Бета-лактамы – семейство антибиотиков, включающее более 6 структурных разновидностей, каждая из которых содержит 2-ацетидиноновое кольцо. Они проявили нео-

бычайно высокую активность против широкого спектра бактериальных патогенов, обладая при этом низкой (если не нулевой) токсичностью для клеток млекопитающих. Принято

считать, что антибиотики бета-лактамы – самые удачные антибактериальные препараты с начала эры антибиотиков [1]. Устойчивость бактерий к бета-лактамам и ингибиторам бета-лактамаз – непрерывно растущая проблема. За последние 60 лет частота и уровень устойчивости бактерий к данному классу антибиотиков неуклонно возрастали, вплоть до настоящего момента, когда многие полагают, что бета-лактамы вскоре окажутся неспособными бороться с тяжелыми бактериальными инфекциями [2]. Считается, что основным механизмом возрастающей резистентности бактерий к данному классу антибактериальных препаратов является врожденная либо приобретенная способность продуцировать бета-лактамазы – ферменты, способные гидролизовать эндоциклическую пептидную связь в бета-лактамах антибиотиков [3, 4, 5]. Выявление факта продукции бета-лактамаз болезнетворными бактериями и оценка их способности гидролизовать ключевые антибиотики бета-лактамы ряда лежит в основе способа коррекции антибактериальной терапии, широко применяемого в практике работы соматических и инфекционных стационаров. Для этого обычно используют диско-диффузионный метод либо (гораздо реже) метод Е-тестов либо серийных разведений в агаре [6]. Тем не менее, перечисленные методы бактериологического анализа имеют, наряду с достоинствами, и серьезные недостатки. Так, считающийся наиболее точным и обладающий наилучшей воспроизводимостью метод серийных разведений в агаре отличается высокой стоимостью, значительной сложностью проведения, большим расходом реагентов и лабораторной посуды, строгими требованиями к качеству питательных сред и соблюдению рекомендованных способов их приготовления, а также значительной продолжительностью собственно анализа. Метод Е-тестов прост в исполнении, но наборы реагентов для него чрезвычайно дороги. В свою очередь, диско-диффузионный метод позволяет получить удовлетворительную воспроизводимость результатов только при условии соблюдения достаточно строгих рекомендованных условий тестирования и приготовления расходных материалов [7, 8], что на практике приводит к существенным раз-

личиям в результатах данного анализа, получаемых на идентичном материале в разных лабораториях. Более того, постоянно встает вопрос о сопоставимости данных, полученных с использованием разных методов анализа антибиотикоустойчивости.

С целью упрощения, ускорения и удешевления процедуры анализа устойчивости микроорганизмов к бета-лактамам антибиотикам, а также унификации получаемых результатов нами разработана тест-система «БиоЛактам». Указанная тест-система позволяет количественно оценивать уровень бета-лактамазной активности в биологических жидкостях (сыворотке крови, спинномозговой жидкости, моче, слюне, мокроте), а также в бактериальных суспензиях, приготовленных из заранее выделенных чистых культур микроорганизмов.

Соответственно, целью настоящего исследования была оценка принципиальной возможности определения бета-лактамазной активности бактериальных суспензий при помощи тест-системы «БиоЛактам», а также анализ соответствия получаемых результатов данным общепринятых методов бактериологического обследования.

Методы

Бактериальные суспензии приготавливались из свежих (суточной инкубации) чистых культур энтеробактерий и золотистых стафилококков. Выделение и идентификацию микроорганизмов выполняли в соответствии с общепринятыми рекомендациями [9]. Исходным материалом для приготовления суспензий служили чистые культуры бактерий, растущие на поверхности питательных сред (Эндо либо Ресселя – для энтеробактерий, желточно-солевом агаре – для стафилококков) в пробирках с «косым агаром». В пробирку с питательной средой вносилось 2-3 мл стерильного физиологического раствора хлорида натрия. После этого пробирка энергично встряхивалась до тех пор, пока жидкость над агаром не становилась опалесцирующей. Затем жидкость извлекалась из пробирки и (при необходимости) разводилась стерильным физиологическим раствором хлорида натрия до 0,5 ЕД стандарта мутности Макфарланда путем сравнения с эталоном. Часть полученной

взвеси использовалась для определения бета-лактамазной активности, остаток мог быть использован для определения устойчивости бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом. Чувствительность анализа заметно повышалась, если бактериальная взвесь перед анализом подвергалась однократному замораживанию – оттаиванию, что приводило к разрушению части бактериальных тел и высвобождению заключенных в них бета-лактамаз. Все изученные нами изоляты микроорганизмов были протестированы на предмет устойчивости к ампициллину, цефотаксиму и амоксициллин/клавуланату, что должно было позволить нам зафиксировать продукцию бета-лактамаз вообще, и БЛРС – в частности. При этом был использован диско-диффузионный метод в его классическом варианте [6].

Всего был собран и изучен 131 клинический изолят, в том числе 45 изолятов *E. coli*, 29 изолятов *Cytrobacter frondi*, 21 изолят *Staphylococcus aureus*, 10 изолятов *Proteus vulgaris*, 6 изолятов *Proteus mirabilis*, 5 изолятов *Salmonella enteritidis*, по 4 изолята *Enterobacter cloacae* и *Klebsiella pneumoniae*, по 2 изолята *Salmonella london* и *Salmonella virchow*, и по 1 изоляту *Proteus morganii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*. Общеизвестно, что непатогенные и условно-патогенные энтеробактерии, а также золотистые стафилококки – комменсалы кожных покровов и слизистых, – отличаются высоким уровнем продукции бета-лактамаз (обычно класса А), нередко превышающим таковой у болезнетворных бактерий [10-15]. Кроме того, патогенные и непатогенные энтеробактерии свободно обмениваются факторами резистентности (обычно – перевиваемыми R-плазмидами), что было неоднократно документировано в научной литературе [12, 16].

В основе функционирования тест-системы «БиоЛактам» лежит хроматографическая методика, базирующаяся на изменении окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде его бета-лактамной связи. При этом происходит батохромный сдвиг в хромофорной системе молекулы, и окраска реакционной смеси меняется с желтой на красно-оранжевую. Максимум поглощения продукта реакции меняется с 390 нм на 486 нм, что и

делает возможным спектрофотометрическую детекцию. Показано, что нитроцефин разрушается всеми известными бета-лактамазами [17]. Для экспериментов мы использовали химически чистый нитроцефин производства Calbiochem (кат. № 484400). Бета-лактамазная активность оценивалась в % распада стандартного количества нитроцефина, вносимого в каждую пробу.

Статистический анализ результатов исследования производился при помощи аналитических пакетов Statistica 8.0 и SPSS 19.

В качестве показателей центральной тенденции значений изучаемых признаков использовали среднее арифметическое (М) и/или медиану (Me) с указанием 95% доверительного интервала. При необходимости охарактеризовать разброс значений какого-либо признака указывали его минимальное и максимальное значения, а также первый и третий квартили. Уровень достоверности нулевой гипотезы (р) для принятия решения о значимости полученных результатов во всех тестах был принят равным или менее 0,05. Для выявления корреляционных взаимосвязей мы использовали метод ранговых корреляций Спирмена, для подтверждения достоверности различий изучаемых признаков в независимых выборках – U-тест Манна-Уитни или медианный тест (при попарном сравнении переменных) либо дисперсионный анализ Краскела-Уоллеса (при одновременном сравнении переменных в 3 и более выборках).

Оценка эффективности диагностических методик определялась при помощи ROC-анализа с построением ROC-кривых и расчетом «отсечных» значений бета-лактамазной активности, соответствующих оптимальному сочетанию чувствительности и специфичности метода. Для данных вычислений мы использовали программу MedCalc 10.2.

Результаты и обсуждение

Анализ устойчивости испытуемых микроорганизмов к ключевым антибиотикам бета-лактамного ряда с применением диско-диффузионного метода показал, что 73 изолята из 131 (55,7%, 95% ДИ: 47,2...64,2) оказались устойчивы к ампициллину (из них 16, или 21,9% – умеренно чувствительны к данному антибиотику). Устойчивыми к амоксициллин/

клавуланату оказались 49 изолятов (37,4%, 95% ДИ: 29,1...45,7), в том числе умеренно чувствительных – 19 (38,8%). Устойчивыми к цефотаксиму оказалось всего 17 изолятов (13,0%, 95% ДИ: 7,2...18,7), из них умеренно чувствительных – 6 (35,3%).

Параллельный анализ бета-лактамазной активности тех же клинических изолятов бактерий, выполненный нами при помощи тест-системы «БиоЛактам», показал, что большая часть анализируемых микроорганизмов (111, или 84,7%, 95% ДИ: 78,6...90,9) обладала ненулевой бета-лактамазной активностью, т.е. продуцировала те или иные бета-лактамазы. Средний уровень и дисперсия значений указанной активности несколько разнились в зависимости от избранной методики пробоподготовки: так, в варианте, когда определялась активность нативной бактериальной суспензии, данные показатели составили 20,1% (95% ДИ: 14,8...25,4), медиана уровня активности – 7,3% (25% – 2,8, 75% – 25,0); в случае же, когда бактериальная суспензия перед анализом была подвергнута кратковременному замораживанию/оттаиванию, средний уровень регистрируемой бета-лактамазной активности составил 34,3% (95% ДИ: 28,0...40,5), а медиана – 17,4% (25% – 6,6, 75% – 63,2). Повышение регистрируемой бета-лактамазной активности, вероятно, происходит вследствие разрушения микробных тел с высвобождением содержащихся в их цитоплазме бета-лактамаз. Разница между медианами уровней бета-лактамазной активности бактериальных суспензий, регистрируемых при обоих вариантах пробоподготовки, оказалась статистически значимой (медианный критерий, $p=0,007$).

Корреляционный анализ Спирмена показал наличие статистически значимых обратных корреляций средней силы между уровнем бета-лактамазной активности бактериальных суспензий (здесь и далее – регистрируемой при использовании обработки замораживанием/оттаиванием для подготовки проб) и диаметрами зон ингибирования вокруг дисков с ампициллином ($R=-0,683$, $p<0,0001$, $n=130$), амоксициллин/клавуланатом ($R=-0,624$, $p<0,0001$, $n=130$) и цефотаксимом ($R=-0,515$, $p<0,0001$, $n=130$). Выявлены также прямые корреляции средней силы между уровнем бета-лактамазной активности

бактериальных суспензий и наличием у соответствующих микроорганизмов устойчивости к вышеперечисленным антибиотикам (определенной при помощи диско-диффузионного анализа) – ампициллину ($R=0,615$, $p<0,0001$, $n=130$), амоксициллину/клавуланату ($R=0,587$, $p<0,0001$, $n=130$) и цефотаксиму ($R=0,477$, $p<0,0001$, $n=130$). Таким образом, можно утверждать, что существует достаточно хорошее соответствие между результатами применения диско-диффузионного метода и разработанной нами тест-системы «БиоЛактам».

Проведенный нами ROC-анализ показал, что при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии, равном или превышающем 14,2%, соответствующий возбудитель продуцирует клинически значимые количества бета-лактамаз, что приводит к существенному снижению эффективности антибиотиков бета-лактаманного ряда (кроме цефалоспоринов 3-4 поколения, карбапенемов, монобактамов и ингибитор-защищенных препаратов). При сравнении с диско-диффузионным методом в качестве референсного чувствительность методики составляет 76,4% (95% ДИ: 64,9...85,6), специфичность – 82,8% (95% ДИ: 70,6...91,4), $AUC=0,856$ (95% ДИ: 0,784...0,912), $p<0,0001$.

Если определенная в процессе эксперимента бета-лактамазная активность бактериальной взвеси равна или превышает 26,5%, то соответствующий возбудитель устойчив также и к ингибитор-защищенным бета-лактамам. При сравнении с диско-диффузионным методом в качестве референсного чувствительность методики составляет 79,2% (95% ДИ: 65,0...89,5), специфичность – 79,3% (95% ДИ: 68,9...87,4), $AUC=0,850$ (95% ДИ: 0,777...0,907), $p<0,0001$.

В случае же, если зарегистрированная в ходе анализа бета-лактамазная активность бактериальной взвеси равна или превышает 81,2%, соответствующий возбудитель устойчив также к цефалоспорином третьего поколения, т.е., возможно, является продуцентом БЛРС. При сравнении с диско-диффузионным методом в качестве референсного чувствительность методики составляет 82,4% (95% ДИ: 56,6...96,0), специфичность – 94,7% (95% ДИ: 88,8...98,8), $AUC=0,908$ (95% ДИ: 0,844...0,951), $p<0,0001$.

Таким образом, разработанная нами тест-система «БиоЛактам» позволяет с высокой степенью достоверности получать ряд важных сведений об устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам бета-лактаминового ряда, что является необходимым условием для проведения рациональной антибактериальной терапии.

Можно заключить, что тест-система «БиоЛактам» не конкурирует с диско-диффузионным методом, а дополняет его, позволяя получать важную информацию о природе антибиотикоустойчивости микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний.

Заключение

1. Разработанная нами тест-система «БиоЛактам» может успешно использоваться для качественной и количественной оценки бета-лактамазной активности бактериальных суспензий. Получаемые при этом результаты хорошо согласуются с данными параллельных исследований с применением диско-диффузионного метода, с поправкой на неизбежные огрехи при постановке последнего, а также с учетом того факта, что устойчивость ряда микроорганизмов к бета-лактаминам антибиотикам не связана с продукцией бета-лактамаз;

2. При помощи тест-системы «БиоЛактам» можно с высокой степенью достоверности определить:

– факт продукции клинически значимых количеств бета-лактамаз при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии $\geq 14,2\%$ (чувствительность данного теста составляет $76,4\%$, специфичность – $82,8\%$);

– факт устойчивости к ингибитор-защищенным бета-лактаминам при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии $\geq 26,5\%$ (чувствительность данного теста составляет $79,2\%$, специфичность – $79,3\%$);

– факт устойчивости к цефалоспорином 3-го поколения при уровне бета-лактамазной активности бактериальной суспензии $\geq 81,2\%$ (чувствительность данного теста составляет $82,4\%$, специфичность – $94,7\%$).

Литература

1. Pérez-Llarena, F. J. Beta-lactamase inhibitors: the story so far / F. J. Pérez-Llarena, G. Bou // *Curr.*

Med. Chem. – 2009. – Vol. 16, N 28. – P. 3740-3765.

2. Abeylath, S. C. Drug delivery approaches to overcome bacterial resistance to beta-lactam antibiotics / S. C. Abeylath, E. Turos // *Expert. Opin. Drug. Deliv.* – 2008 Sep. – Vol. 5, N 9. – P. 931-949.

3. Rolinson, G. N. Evolution of beta-lactamase inhibitors / G. N. Rolinson // *Rev. Infect. Dis.* – 1991 Jul-Aug. – Vol. 13, N 9. – P. S727-S732.

4. Sawai, T. Mechanisms of bacterial resistance to beta-lactams by beta-lactamases / T. Sawai // *Nippon Rinsho.* – 1997 May. – Vol. 55, N 5. – P. 1225-1230.

5. Trehan, I. Inhibition of AmpC beta-lactamase through a destabilizing interaction in the active site / I. Trehan, B. M. Beadle, B. K. Shoichet // *Biochemistry.* – 2001 Jul. – Vol. 40, N 27. – P. 7992-7999.

6. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 10th informational supplement // *NCCLS Document M100-S9.* – 1999. – P. 141-156.

7. Решедько, Г. К. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом / Г. К. Решедько, О. У. Стецюк // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2001. – Т. 3, № 4. – С. 348-354.

8. Basic laboratory procedures in clinical bacteriology / J. Vandepitte [et al.]. – Geneva : World Health Organization (WHO), 1991. – 128 p.

9. Энтеробактерии : рук. для врачей / И. В. Голубева [и др.] ; под ред. В. И. Покровского. – М. : Медицина, – 1985. – 320 с.

10. Desgrandchamps, D. Antibiotics 1992: mechanism of resistance and its clinical relevance / D. Desgrandchamps // *Schweiz. Med. Wochenschr.* – 1992 Feb. – Vol. 122, N 8. – P. 247-256.

11. Livermore, D. M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics / D. M. Livermore // *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* – 1991. – Vol. 78. – P. 7-16.

12. Medeiros, A. A. Spread of a «Pseudomonas-specific» beta-lactamase to plasmids of enterobacteria / A. A. Medeiros, R. W. Hedges, G. A. Jacoby // *J. Bacteriol.* – 1982 Feb. – Vol. 149, N 2. – P. 700-707.

13. Occurrence and mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in clinically important species of *Enterobacter* / D. Michálová-Papajová [et al.] // *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* – 2001 Aug. – Vol. 50, N 3. – P. 121-130.

14. Okamoto, R. AmpC beta-lactamases producing bacteria / R. Okamoto, R. Nakano // *Nippon Rinsho.* – 2001 Apr. – Vol. 59, N 4. – P. 707-711.

15. Philippon, A. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork / A. Philippon, G. Arlet // Ann. Biol. Clin. – 2006 Jan-Feb. – Vol. 64, N 1. – P. 37-51.
16. Characterization of endemic *Shigella flexneri* strains in Somalia: antimicrobial resistance, plasmid profiles, and serotype correlation / M. Casalino [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1994 May. – Vol. 32, N 5. – P. 1179-1183.
17. Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate / H. C. O'Callaghan [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 1972 Apr. – Vol. 1, N 4. – P. 283-288.

Поступила 30.09.2014 г.

Принята в печать 07.10.2014 г.

Сведения об авторах:

Семенов В.М. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Дмитраченко Т.И. – д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Жильцов И.В. – д.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Кубраков К.М. – к.м.н., доцент кафедры неврологии и нейрохирургии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Зенькова С.К. – к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Скворцова В.В. – к.м.н., доцент кафедры инфекционных болезней УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»;

Веремей И.С. – старший лаборант кафедры инфекционных болезней УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра инфекционных болезней. Тел. моб.: +375 (29) 681-61-06 – Семенов Валерий Михайлович.